

REG'D PCT/PTO

23 MAR 2005

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/13021

17.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2002年10月10日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2002-297602  
[ST. 10/C]: [JP 2002-297602]

出 願 人  
Applicant(s): 鐘淵化学工業株式会社

RECEIVED	
09 JAN 2004	
WIPO	PCT

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

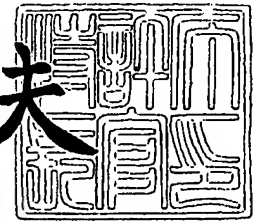
PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

BEST AVAILABLE COPY

2003年12月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-310487

【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-4899

【提出日】 平成14年10月10日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 1/21  
C12N 15/09  
C12P 7/62

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町清水町 1 4 5 5 - 1

【氏名】 中嶋 敏光

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市西畑 1 丁目 1 3 番 1 - 3 0 3

【氏名】 小田原 修

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県明石市二見町東二見 1 6 3 0 シーハイツ 2 0 1 号

【氏名】 横溝 聡

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 共重合ポリエステルの生産方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 少なくとも 3-ヒドロキシ酪酸と 3-ヒドロキシヘキサン酸からなる共重合ポリエステルの微生物による生産方法であって、栄養源であるリンを制限した条件下で、構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する油脂を炭素源として培養することを特徴とする共重合ポリエステルの生産方法。

【請求項 2】 炭素源として使用する油脂の構成脂肪酸中のラウリン酸含量が 10 重量%以上である請求項 1 記載の生産方法。

【請求項 3】 炭素源として使用する油脂が、パーム核油、ヤシ油、またはこれらの油脂を分別して得られる分別油脂の中から選ばれる少なくとも 1 種の油脂を含む油脂である請求項 1 または 2 記載の生産方法。

【請求項 4】 微生物による共重合ポリエステルの生産性が 40 g/L 以上で、且つ共重合ポリエステル中の 3-ヒドロキシヘキサン酸の含有率が 4 mol % 以上である請求項 1 ～ 3 記載の生産方法。

【請求項 5】 微生物がアエロモナス・キャビエ (*Aeromonas caviae*) より単離されたポリエステル重合酵素遺伝子を組み込まれた形質転換微生物である請求項 1 ～ 4 記載の生産方法。

【請求項 6】 微生物がラルストニア・ユートロファ (*Ralstonia eutropha*) であることを特徴とする請求項 1 ～ 5 記載の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、微生物を用いて 3-ヒドロキシ酪酸（以下、3HB と略す）と 3-ヒドロキシヘキサン酸（以下、3HH と略す）を含む共重合ポリエステルを生産する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

現在までに数多くの微生物において、エネルギー貯蔵物質としてポリエステル

を菌体内に蓄積することが知られている。その代表例がポリ-3-ヒドロキシ酪酸（以下、P（3HB）と略す）である。P（3HB）は熱可塑性高分子であり、自然環境中で生物的に分解されることから、環境にやさしいグリーンプラスチックとして注目されている。しかし、P（3HB）は結晶性が高いため、硬くて脆い性質を持っていることから実用的には応用範囲に限られる。この為、この性質の改良を目的とした研究がなされてきた。

#### 【0003】

その中で、3-ヒドロキシ酪酸（3HB）と3-ヒドロキシ吉草酸（以下、3HVと略す）からなる共重合体P（3HB-co-3HV）、およびその製造方法が開発された（特許文献1～3）。このP（3HB-co-3HV）は、P（3HB）に比べると柔軟性に富むため、幅広い用途に応用できると考えられた。これらの特許文献における共重合体の製造方法は、従来のP（3HB）の製造方法と同様に、前段で菌体を増殖させ、後段で窒素またはリンを制限して微生物を培養し、共重合体を製造するものである。またP（3HB-co-3HV）については、3HVの含有率が増えるにつれて柔軟性が変化することから、3HVの含有率を制御する研究もなされてきた。例えば、特許文献1や特許文献4ではプロピオン酸を使用し、また特許文献5ではプロパン-1-オールを使用し、それらの培地中への添加量を変えることにより3HVの含有率を制御しており、3HV含有率が10～90mol%のP（3HB-co-3HV）が製造されている。しかしながら、実際のところP（3HB-co-3HV）はその3HV含有率を増加させても、それに伴う物性の変化が乏しく、特にフィルムなどに使用するのに要求される程、柔軟性が向上しないため、シャンプーボトルや使い捨て剃刀の取っ手など硬質成型体の分野にしか利用されなかった。

#### 【0004】

このような状況下、上述の3HBと3HVの共重合体の欠点をカバーすることを目的とし、3HBと3HV以外のヒドロキシ酸、例えば、3-ヒドロキシプロピオン酸（以下、3HPと略す）、3-ヒドロキシペンタン酸（以下、3HCと略す）、3-ヒドロキシヘキサン酸（3HH）、3-ヒドロキシオクタン酸（以下、3HOと略す）、3-ヒドロキシノナン酸（以下、3HNと略す）、3-ヒ

ドロキシデカン酸（以下、3HDと略す）、3-ヒドロキシドデカン酸（以下、3HDDと略す）などを構成要素として含む共重合ポリエステルが精力的に研究されている（非特許文献1）。その中でも、注目すべきものとして、3HBと3HHを含む共重合ポリエステル、特に3HBと3HHからなる共重合ポリエステルP（3HB-co-3HH）と、その製造方法についての研究がある（特許文献6, 7）。これら特許文献のP（3HB-co-3HH）等の共重合ポリエステルの製造方法は、土壌より単離されたアエロモナス・キャビエ（*Aeromonas caviae*）を用いて、オレイン酸等の脂肪酸やオリーブオイル等の油脂から発酵生産するものである。また、P（3HB-co-3HH）の性質に関する研究もなされている（非特許文献2）。この文献では炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源として、*A. caviae*を培養し、3HH含有率が11~19mol%のP（3HB-co-3HH）を発酵生産している。その結果、このP（3HB-co-3HH）は、3HH含有率が増加するにしたがって、P（3HB）の硬くて脆い性質から次第に柔軟な性質を示すようになり、P（3HB-co-3HV）を上回る柔軟性を示すことが明らかにされた。

#### 【0005】

また、*A. caviae*のPHAシンターゼ遺伝子をクローニングし、この遺伝子を、90%以上のPHB蓄積能を有する*R. eutropha*に導入した組換え株を用いて、脂肪酸を炭素源としてP（3HB-co-3HH）を生産する報告がなされた（非特許文献3, 特許文献8）。このなかで、オクタン酸ナトリウムを炭素源とすることで、3HH含有率が10~20mol%のP（3HB-co-3HH）が生産できると報告している。さらに、最近になって、上記組換え株を用いてポリエステルを生産する際に、複数種の炭素源を用いる方法が開示され、炭素源として用いる油脂や脂肪酸の炭素数が、P（3HB-co-3HH）の3HH含有率に影響を与えることが明らかとなった（特許文献9）。

#### 【0006】

今後、P（3HB-co-3HH）の3HH含有率を広い範囲で任意にコントロールして共重合体を製造することができれば、硬い共重合体から柔らかい共重合体まで発酵生産可能となり、テレビの筐体などのように硬さを要求されるもの

から糸やフィルムなどのような柔軟性を要求されるものまで、幅広い分野への応用が期待できるものと考えられている。

【0007】

【特許文献1】

特開昭57-150393号公報

【0008】

【特許文献2】

特開昭59-220192号公報

【0009】

【特許文献3】

特表平11-500008号公報

【0010】

【特許文献4】

特開昭63-269989号公報

【0011】

【特許文献5】

特公平7-79705号公報

【0012】

【特許文献6】

特開平5-93049号公報

【0013】

【特許文献7】

特開平7-265065号公報

【0014】

【特許文献8】

特開平10-108682号公報

【0015】

【特許文献9】

特開2001-340078号公報

## 【0016】

## 【非特許文献1】

Poirier Y., Nawrath C., Somerville C, B  
IO/TECHNOLOGY, 13, 142-150, 1995年

## 【0017】

## 【非特許文献2】

Y. Doi, S. Kitamura, H. Abe, Macromolec  
ules 28, 4822-4823, 1995年

## 【0018】

## 【非特許文献3】

T. Fukui, Y. doi, J Bacteriol, vol. 179,  
No. 15, 4821-4830, 1997年

## 【0019】

## 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、P (3HB-co-3HH) の実用化を考えた場合、障壁となるのは生産コストの問題である。例えば、既に開示されているいずれの方法においても P (3HB-co-3HH) の生産性は低く、高々、30g/L程度である。また炭素源としては高価な炭素数が12個以上の脂肪酸を唯一の炭素源として利用したり、3HH含有率を向上させるためには高価な脂肪酸（ヘキサン酸）の添加が必要など、該ポリマーの工業生産方法としては到底、適用することができない。上述したように、P (3HB-co-3HH) についてはその3HH含有率が物性に与える影響が顕著で、本発明者らの検討結果によれば、幅広い分野へ応用を可能にするには、3HH含有率として4mol%以上を確保することが好ましい。しかしながら、従来の培養方法では、3HH含有率を向上させようとすると高価な炭素源が必要となるばかりか生産性がより低下する傾向があった（特許文献9参照）。

## 【0020】

そこで低コストで高い菌体生産性とポリマー含量を実現し、工業的見地からはより高いP (3HB-co-3HH) の生産性と、その生産性を確保しながら、

かつ 4 mol % 以上の 3HH 含有率を有する P (3HB-co-3HH) の生産を可能とする方法の開発が待望されていた。本発明は、上記現状に鑑み、低コストで、高い生産性を実現する 4 mol % 以上の 3HH 含有率を有する P (3HB-co-3HH) の生産方法を提供するものである。

#### 【0021】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは様々な検討を行ない、特に種々の発酵原料（炭素源）に関して、価格、供給安定性、品質の安定性、菌体あるいはポリマーの収率などを詳細に検討した結果、P (3HB-co-3HH) を蓄積する微生物を、安価な油脂を炭素源とする培地を用いて培養し、さらに炭素源として使用する油脂の種類と培養条件を選択することにより、高い生産性を保持し、かつその 3HH 含有率を所望の 4 mol % 以上にすることに成功した。

#### 【0022】

即ち本発明の要旨は、微生物を用いて、P (3HB-co-3HH) などの 3HB と 3HH を含む共重合ポリエステルを生産する際に、栄養源であるリンを制限し、構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する油脂を炭素源として用いることによって、40 g/L 以上の高生産性を確保し、且つその 3HH 含有率が好ましくは 4 mol % 以上となる共重合ポリエステルの生産方法に関する。

#### 【0023】

##### 【発明の実施の形態】

本発明の共重合ポリエステルの生産方法は微生物を用いて P (3HB-co-3HH) などの 3HB と 3HH を含む共重合ポリエステルを生産する際に適用される。

#### 【0024】

本発明の生産方法によって生産される共重合ポリエステルは、モノマーユニットとして少なくとも 3HB と 3HH を含むポリエステルであり、3HB と 3HH 以外のモノマーユニットを含んでいても構わない。この場合の第 3 のモノマーユニットとしては、3HV、3HP、3HC、3HO、3HN、3HD、3HDD 等が挙げられる。但し、3HV などの奇数の炭素数の炭素鎖を持つモノマーユ



ニットを共重合させるには、後述する培養方法において安価な炭素源として利用できる天然油脂中にはほとんど存在しない奇数の炭素鎖を持つ炭素源を添加する必要がある。培養コストやその他プロセス的なメリットからは、本発明の生産方法によって生産される共重合ポリエステルとしては、3HBと3HHからなるP(3HB-co-3HH)が好ましい。

#### 【0025】

本発明の生産方法において、使用する微生物には特に制限なく、天然から単離された微生物や菌株の寄託機関（例えばIFO、ATCC等）に寄託されている微生物、Alcaligenes (Ralstonia) 属やAeromonas属、Pseudomonas属、Escherichia属などの細菌類を使用することが出来るが、Ralstonia eutrophaを使用することが好ましい。

#### 【0026】

また、上記微生物が、野生型の状態では目的とする共重合体を生産できない、もしくはその生産量が低い場合には、上記微生物を、ポリエステル重合酵素遺伝子を含む組み換えベクターを用いて形質転換し、得られた形質転換微生物を用いることができる。形質転換微生物を作製する場合のベクターには、その菌内で自律的に増殖しうるプラスミドベクターを用いることができる。また、該ポリエステル重合酵素遺伝子を直接、宿主となる微生物の染色体に組み込んでも良い。

#### 【0027】

本発明のポリエステルの生産方法において用いられるポリエステル重合酵素遺伝子としては、特に限定されないが、アエロモナス・キャビエ (Aeromonas caviae) より単離された遺伝子が好ましく、例えば特許文献8に記載されている遺伝子断片を用いることができる。微生物に組換えベクターを導入する際には、公知の方法が適用できる。例えば、接合法、カルシウム法やエレクトロポレーション法等を用いることができる。

#### 【0028】

本発明に用いられる微生物の一例として、Ralstonia eutrophaに、Aeromonas caviae由来のポリエステル重合酵素遺伝子

を導入した、*Ralstonia eutropha* PHB-4/pJRDEE 32d13株 (T. Fukui., Y. Doi., Appl Microbiol Biotechnol., 49, 333-336, (1998), 寄託番号 FERM P-15786) を好ましく用いることができる。

#### 【0029】

本発明の共重合ポリエステルの生産には、炭素源として、価格、供給安定性、品質の安定性、菌体あるいはポリマーの収率などの点から、安価な油脂を使用する。炭素源以外の栄養源としては、窒素源、無機塩類、そのほかの一般的な有機栄養源を含む培地が使用できるが、生産コスト低減の観点からは高価な有機窒素源、例えばポリペプトン、イーストエキス、肉エキスなどの使用は最少量に留める方が好ましい。

#### 【0030】

本発明の生産方法に用いられる窒素源としては、例えばアンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩である無機窒素源、ペプトン、肉エキス、酵母エキスなどの有機窒素源が挙げられる。無機塩類としては、例えばリン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウムなどが使用される。そのほかの有機栄養源としては、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどアミノ酸、ビタミンB1、ビタミンB12、ビタミンC等のビタミン類が使用される。しかしながら、生産コスト抑制の観点からは有機栄養源であるペプトン、肉エキス、酵母エキスおよびグリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリンなどのアミノ酸、ビタミンB1、ビタミンB12、ビタミンC等のビタミンの使用は最少量とする方が好ましい。

#### 【0031】

P (3HB-co-3HH) に限らず、一般的に微生物によるポリエステルの生産においては、従来、窒素、リンなどの増殖に必要な栄養素の濃度が低くなり、過剰の炭素源が培地中に存在する場合に良好に菌体内にポリエステルが蓄積されるといわれているが、特にどのような栄養制限が好ましいかは詳細には検討されていない。本発明者らによって、窒素を制限した場合のP (3HB-co-3

HH) の生産性は、リンを制限した場合に比べて劣り、また培養条件にもよるが窒素制限下では溶菌の発生が起こることが見いだされた。したがって、本発明の共重合ポリエステルの生産方法においては、窒素は制限せず、リン制限培養を採用する。本発明において、培養中にリンを制限する方法としては、特に限定されず、公知のリン制限培養条件を採択することができる。また、いうまでもなく、本発明においてリンを制限するというのは、培地中にリン原子を全く含まないということではなく、増殖に必要とされる栄養源としてのリンが最低限含まれているということであり、すなわち菌体の増殖量がリンによって規定されている状態をいうのであって、培地中に無機塩として少量含まれるものを排除するものではない。

#### 【0032】

一方、微生物の発酵生産に使用される油脂としては、通常、大豆油、コーン油、綿実油、パーム油、パーム核油、ヤシ油、落花生油などの比較的安定的に供給される天然油脂およびこれらの油脂を分別して得られる各画分、例えば油脂化学業界で通称、パームWオレイン油（パーム油を2回無溶媒分別した低融点画分）、パーム核油オレイン（パーム核油を1回無溶媒分別した低融点画分）などと呼ばれる分別油脂、さらにはこれらを混合した混合油などがあるが、本発明の生産方法においては、油脂の構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する油脂、例えば、油脂化学業界でラウリン油脂と称される油脂を使用することが必要条件となる。構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する天然油脂としては、パーム核油やヤシ油、あるいはこれらの油脂を分別して得られる各画分、例えばパーム核油オレインなどの分別油脂が挙げられ、これら天然のラウリン油脂を使用するのが好ましいが、その他、ラウリン酸を含有しない油脂を化学的あるいは生物化学的に処理して構成脂肪酸にラウリン酸を導入したものや、天然のラウリン油脂を化学的あるいは生物化学的に処理してラウリン酸含量をより高めた油脂を使用しても差し支えない。また、これら構成脂肪酸にラウリン酸を含む油脂を二種以上混合した混合油、あるいは構成脂肪酸にラウリン酸を含む油脂と構成脂肪酸にラウリン酸を含まない油脂を混合した混合油も使用することができる。

#### 【0033】

本発明において使用される油脂の構成脂肪酸中のラウリン酸の含量（混合油を使用する場合は、混合油トータルの構成脂肪酸中の含量合計として計算する）としては、10重量%以上が好ましく、20重量%以上がより好ましい。油脂の構成脂肪酸中のラウリン酸含量を10重量%以上とすることが、40g/L以上の生産性を確保して、4mol%以上の3HH含有率を有する共重合ポリエステルを生産する上で好ましい。ここで、本明細書における共重合ポリエステルの生産性とは、培養終了時の培養液（培地+微生物+その副生産物）中の、生産された共重合ポリエステルの重量濃度である。

#### 【0034】

本発明における、油脂の添加方法としては、一度に大量に添加する、分割して添加する、連続的にあるいは間欠的に流加するなどの方法がいずれも適用できるが、本発明者の検討結果によれば、一度に多量添加すると生成する脂肪酸による細胞毒性が現れたり、脂肪酸に起因する発泡が激しくなり、実際のオペレーションが困難な状況に陥ることがある。したがって、炭素源である油脂は分割して少量ずつ添加する、或いはポンプなどを使用し連続添加あるいは間欠添加するほうが好ましい。

#### 【0035】

現在の技術では、培養液中の非水溶性成分である油脂あるいは油脂がリパーゼによって加水分解して生成する脂肪酸の量をオンラインあるいはオフラインでも正確に測定することは難しい。そこで本発明者らは小型培養実験装置を用いた多くの実験から、油脂供給が律速（枯渇）せず、また発泡の原因となるほど過剰供給とならないような流加パターンを経験的に求め、これを基本ガイドラインとして採用する方法も開発した。実際の操作ではこのガイドラインに則って油脂を流加しながら培養し、ある時間ごとにサンプリングを実施、遠心して、培養上清中の油脂層の厚さを観察しながら流加量を調整するという方法をとるのが好ましい。本発明者らの検討結果によれば、このようにして作りこまれたガイドラインは大型培養槽を用いた培養においても有効活用できることが確認されている。

#### 【0036】

またその他の間接的な方法としては、通気排ガス中の酸素濃度、二酸化炭素濃

度を測定して、酸素消費速度あるいは二酸化炭素発生速度を求め、これらを指標にして油脂の流加速度を変化させることができる。この場合には、予め菌体増殖期およびポリエステル生産期の呼吸特性を詳細に調べて補正を加えるのがより好ましい。

#### 【0037】

本発明の生産方法においては、生産される共重合ポリエステルの 3HH 含有率の範囲を任意に制御することができる。例えば、ヤシ油、パーム核油あるいはこれらの分別油脂などのラウリン油脂を単独あるいはこれらを混合して用いた場合は、5～20 mol% の比較的高い 3HH 含有率を有する P (3HB-co-3HH) が得られ、大豆油、コーン油、綿実油、パーム油、落花生油およびこれらの分別油脂など構成脂肪酸としてラウリン酸を含まない油脂と上述のラウリン油脂を混合した混合油を用いた場合は、10 mol% 以下の比較的低い 3HH 含有率の P (3HB-co-3HH) を生産できる。また、これら混合油を使用し、その混合比を調整することによって構成脂肪酸のラウリン酸含量を変化させることで、任意の 3HH 含有率をもつ多品種の P (3HB-co-3HH) を、40 g/L 以上の高生産性を維持しながら生産できる。また、3HB と 3HH 以外の第三成分をモノマーユニットとする共重合体を生産するためには、上記構成脂肪酸にラウリン酸を含む油脂に、適宜第三成分に相当する炭素源、例えば奇数の炭素鎖を持つ脂肪酸などを添加してやればよい。

#### 【0038】

本発明の生産方法における微生物の培養温度は、その菌の生育可能な温度であればよいが、20～40℃が好ましい。培養時間には特に制限はないが、1～7日程度で良い。また、微生物として形質転換微生物を使用する際は、培地中に、ベクター等に存在する耐性遺伝子に対応するカナマイシン、アンピシリン、テトラサイクリン等の抗生物質を添加することができる。

#### 【0039】

本発明の生産方法において、共重合ポリエステルを微生物から回収する方法は、特に制限されず、公知の溶媒抽出法、物理的破碎法、化学的处理などが採用でき、例えば、次のような方法が使用できる。培養終了後、培養液を遠心分離器な

どで菌体を分離し、その菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄した後、乾燥させる。この乾燥菌体をクロロホルム等の有機溶剤を用いてポリエステルを抽出する。このポリエステルを含んだ有機溶剤溶液を濾過等によって菌体成分を除去し、そのろ液にメタノールやヘキサン等の貧溶媒を加えてポリエステルを沈殿させる。濾過や遠心分離によって上澄み液を除去し、乾燥させてポリエステルを回収する。

#### 【0040】

得られたポリエステルのモノマーユニットの分析は、例えば、ガスクロマトグラフ法や核磁気共鳴法などにより行う。

#### 【0041】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術範囲を限定するものではない。

#### 【0042】

##### 【実施例】

(実施例1および比較例1)

*Ralstonia eutropha* PHB-4/pJRDEE32d13株 (T. Fukui., Y. Doi., Appl Microbiol Biotechnol., 49, 333-336, (1998), 受託番号FERMP-15786) (以下Red13株と略す。)を次のように培養した。

#### 【0043】

種培地の組成は1w/v% Meat-extract、1w/v% Bacto-Trypton、0.2w/v% Yeast-extract、0.9w/v%  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.15w/v%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、(pH6.8)とした。

#### 【0044】

前培養培地の組成は1.1w/v%  $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.19w/v%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1.29w/v%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.1w/v%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2.5w/v% パームWオレイン油、0.5v/v% 微量金属塩溶液 (0.1N塩酸に1.6w/v%  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1w/v%  $\text{CaC}$

$12 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.02\text{ w/v\% CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.016\text{ w/v\% CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.012\text{ w/v\% NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を溶かしたもの。  
)、 $5 \times 10^{-6}\text{ w/v\%}$  カナマイシンとした。

#### 【0045】

ポリエステル生産培地の組成は $0.385\text{ w/v\% Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.067\text{ w/v\% KH}_2\text{PO}_4$ 、 $0.291\text{ w/v\% (NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $0.1\text{ w/v\% MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.5\text{ v/v\%}$  微量金属塩溶液（ $0.1\text{ N}$ 塩酸に $1.6\text{ w/v\% FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $1\text{ w/v\% CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.02\text{ w/v\% CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.016\text{ w/v\% CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $0.012\text{ w/v\% NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を溶かしたもの。）、 $0.05\text{ w/v\% BIOSPUREX 200K}$ （消泡剤：コグニスジャパン製）、 $5 \times 10^{-6}\text{ w/v\%}$  カナマイシンとした。そこに、炭素源として9種の油脂、すなわち、大豆油、綿実油、菜種油、コーン油、パームWオレイン油、落花生油、ヤシ油、パーム核油、パーム核油オレインを用いた。これら油脂は初発培地に $1\text{ w/v\%}$ 加えられ、培養スタート後、図1に示すガイドライン（予備実験によって求めた油脂供給が律速せずかつ過剰ともならない流加パターン）に沿って流加された。

#### 【0046】

Red 13株のグリセロールストック（ $50\text{ }\mu\text{l}$ ）を種培地（ $10\text{ ml}$ ）に接種して24時間培養し、3Lの前培養培地を入れた5Lジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニア製MDL-500型）に $0.2\text{ v/v\%}$ 接種した。運転条件は、培養温度 $30^\circ\text{C}$ 、攪拌速度 $500\text{ rpm}$ 、通気量 $1.8\text{ L/min}$ とし、pHは $6.7 \sim 6.8$ の間でコントロールしながら28時間培養した。pHコントロールには7%水酸化アンモニウム水溶液を使用した。

#### 【0047】

ポリエステル生産培養は6Lの生産培地を入れた10Lジャーファーマンター（丸菱バイオエンジニア製MDL-1000型）に前培養種母を $1.0\text{ v/v\%}$ 接種した。運転条件は、培養温度 $28^\circ\text{C}$ 、攪拌速度 $400\text{ rpm}$ 、通気量 $3.6\text{ L/min}$ とし、pHは $6.7 \sim 6.8$ の間でコントロールした。pHコントロールには7%水酸化アンモニウム水溶液を使用した。培養は60時間行い、培養終了

後、遠心分離によって菌体を回収し、メタノールで洗浄後、凍結乾燥し、乾燥菌体重量等を測定した。

#### 【0048】

得られた乾燥菌体約 1 g に 100 ml のクロロホルムを加え、室温で一昼夜攪拌して、菌体内のポリエステルを抽出した。菌体残渣をろ別後、エバポレーターで総容量が約 30 ml になるまで濃縮後、約 90 ml のヘキサンを徐々に加え、ゆっくり攪拌しながら、1 時間放置した。析出したポリエステルをろ別後、50℃で 3 時間真空乾燥した。乾燥ポリエステルの重量を測定し、菌体内のポリエステル含量を算出した。

#### 【0049】

得られた乾燥ポリエステル約 20 mg に 2 ml の硫酸-メタノール混液 (15 : 85) と 2 ml のクロロホルムを添加して密栓し、100℃で 140 分間加熱することでポリエステル分解物のメチルエステルを得た。冷却後、これに 1.5 g の炭酸水素ナトリウムを少しずつ加えて中和し、炭酸ガスの発生がとまるまで放置した。4 ml のジイソプロピルエーテルを添加してよく混合した後、遠心して、上清中のポリエステル分解物のヒドロキシアルカン酸メチルエステルの組成をキャピラリーガスクロマトグラフィーにより分析し、得られたポリエステルのモノマーユニットの組成 (含有率) を求めた。ガスクロマトグラフは島津製作所 GC-17A、キャピラリーカラムは GLサイエンス社製 NEUTRA BOND-1 (カラム長 25 m、カラム内径 0.25 mm、液膜厚 0.4  $\mu$ m) を用いた。温度条件は、初発温度 100℃～200℃まで 8℃/分の速度で昇温、さらに 200℃～290℃まで 30℃/分の速度で昇温した。

#### 【0050】

炭素源として用いた各油脂のラウリン酸含量および油脂の違いが P (3HB-co-3HH) の 3HH モル分率および生産性に与える影響を表 1 に示した。表 1 には培養 60 h 目の結果を示した。

#### 【0051】



【表 1】

油脂		P(3HB-co-3HH)生産量 (g/L)	3HH含有率 (mol%)	使用した油脂の ラウリン酸含量 (重量%)
比較例 1	大豆油	62	3.0	0
	綿実油	56	2.5	0
	菜種油	52	2.7	0
	コーン油	68	2.7	0
	パームWオレイン油	62	3.0	0
	落花生油	45	3.6	0
実施例 1	ヤシ油	42	13.8	47
	パーム核油	48	6.8	47
	パーム核油オレイン	71	7.9	41

この結果から、構成脂肪酸としてラウリン酸を含むヤシ油、パーム核油、パーム核油オレインでは3HH含有率が6～14mol%と高く、構成脂肪酸としてラウリン酸を含まない他の油脂では、いずれも4mol%未満の3HH含有率となった。基質として用いた油脂の違い、ラウリン酸の有無により、品質、物性に影響が顕著である3HH含有率が大きく変化することがわかった。パーム核油オレイン以外のラウリン油脂では他の油脂に比べ生産性が少し低いが、工業生産に供することができる40g/L以上の生産性は確保されていた。

## 【0052】

(実施例2、比較例2)

実施例1と同様の油脂を用い、それぞれの油脂を初発に3w/v(%)加え、その後、培養12時間ごとに培養48時間目まで2w/v(%)添加した以外は実施例1と同様にして培養した。表2に培養60h目の結果を比較した。

## 【0053】

【表 2】

	油脂	P(3HB-co-3HH)生産量 (g/L)	3HH含有率 (mol%)
	大豆油	64	2.5
比	綿実油	60	2.3
較	菜種油	56	2.1
例	コーン油	71	2.2
2	パームWオレイン油	65	2.8
	落花生油	45	3.8
実	ヤシ油	45	10.4
施	パーム核油	48	5.9
例	2 パーム核油オレイン	72	5.8

発泡は培養全般を通じ、いずれの油脂においても、実施例 1 に比べ、激しかったが、油脂を分割添加した場合もラウリン酸含量の高いヤシ油、パーム核油、パーム核油オレインで 40 g/L 以上の高生産性が得られ、所望の 4 mol % 以上の 3HH 含有率が達成された。

## 【0054】

(実施例 3、比較例 3)

実施例 1 と同様の油脂を用い、それぞれの油脂を 15 ml/h の速度で培養 0 h ~ 57 h まで一定流量で流加した以外は実施例 1 と同様にして培養した。表 3 に培養 60 h 目の結果を比較した。

## 【0055】

【表 3】

	油脂	P(3HB-co-3HH)生産量 (g/L)	3HH含有率 (mol%)
比較例 3	大豆油	60	2.7
	綿実油	54	2.7
	菜種油	50	2.5
	コーン油	66	2.3
	パームWオレイン油	64	2.7
	落花生油	42	3.9
実施例 3	ヤシ油	43	9.6
	パーム核油	45	5.6
	パーム核油オレイン	70	6.0

発泡は培養中期に、いずれの油脂においても、実施例 1 に比べ、激しくなったが、油脂を一定速度で流加した場合も、ラウリン酸含量の高いヤシ油、パーム核油、パーム核油オレインで、4 mol%以上の 3HH 含有率を確保しながら、40 g/L 以上の高生産性が得られた。

## 【0056】

(実施例 4)

油脂としてパーム核油オレインとヤシ油 1 : 1 (v/v)、パーム核油オレインと落花生油 1 : 1 (v/v)、パーム核油オレインと大豆油 1 : 1 (v/v)、パーム核油オレインとコーン油 1 : 1 (v/v) の混合油を用いた以外は実施例 1 と同様の培地・条件で培養を行い、表 4 に示す結果を得た。表 4 には培養 60 h 目の結果を比較した。

## 【0057】

【表 4】

【表4】

混合油	P(3HB-co-3HH)生産量 (g/L)	3HH含有率 (mol%)
パーム核油オレインとヤシ油 1 : 1 (v/v)	68	8.5
パーム核油オレインと落花生油 1 : 1 (v/v)	65	6.2
パーム核油オレインと大豆油 1 : 1 (v/v)	72	5.2
パーム核油オレインとコーン油 1 : 1 (v/v)	67	4.5

ラウリン油脂を含む混合油とすることによって基質油脂中のラウリン酸含量を高めた結果、3 mol %以下の3HH含有率をもつP(3HB-co-3HH)しか得られなかったコーン油、大豆油を用いても、好ましい物性が得られる4 mol %以上の3HH含有率を有するP(3HB-co-3HH)が生産された。落花生油とヤシ油の場合は混合油とすることによって、生産性は向上し、3HH含有率は混合前のそれぞれの油脂の中間値を示した。

## 【0058】

## (実施例5)

基質としてパーム核油オレインと大豆油の混合油4種類、混合油A(パーム核油オレイン/大豆油=75/25(v/v))、混合油B(パーム核油オレイン/大豆油=50/50(v/v))、混合油C(パーム核油オレイン/大豆油=25/75(v/v))、混合油D(パーム核油オレイン/大豆油=20/80(v/v))、を用いた以外は実施例1と同様の培地・条件で培養を行い、表5に示す結果を得た。表5には培養60h目の結果を示した。

## 【0059】

【表 5】

混合油	P(3HB-co-3HH)生産量 (g/L)	3HH含有率 (mol%)	混合油の ラウリン酸含量 (重量%)
混合油A (パーム核油オレイン/大豆油=75/25 (v/v))	68	6.1	30.8
混合油B (パーム核油オレイン/大豆油=50/50 (v/v))	72	5.2	20.5
混合油C (パーム核油オレイン/大豆油=25/75 (v/v))	70	4.7	10.3
混合油D (パーム核油オレイン/大豆油=20/80 (v/v))	72	3.2	8.2

表5に示されているように生産性については混合度合いの違いによる差はあま

り認められないが、3HH含有率については、混合油中のパーム核油オレインの割合が多いほど高くなり、特に、ラウリン酸含量が10重量%以上の混合油においては、好ましい物性を示す4mol%以上の3HH含有率を有するP（3HB-co-3HH）を生産することができた。

#### 【0060】

##### 【発明の効果】

本発明の方法において、リンを制限し、炭素源としてラウリン酸を含有する油脂を用いる事により、好ましい物性を呈する所望の3HH含有率を有するP（3HB-co-3HH）を、40g/L以上の高生産性を確保しながら生産できる。また、油脂中の構成脂肪酸のラウリン酸含量を10重量%以上とすることで、4mol%以上の3HH含有率を有するP（3HB-co-3HH）を、40g/L以上の高生産性を確保しながら生産できる。したがって、応用範囲の広いP（3HB-co-3HH）を工業的に生産、提供できるようになる。

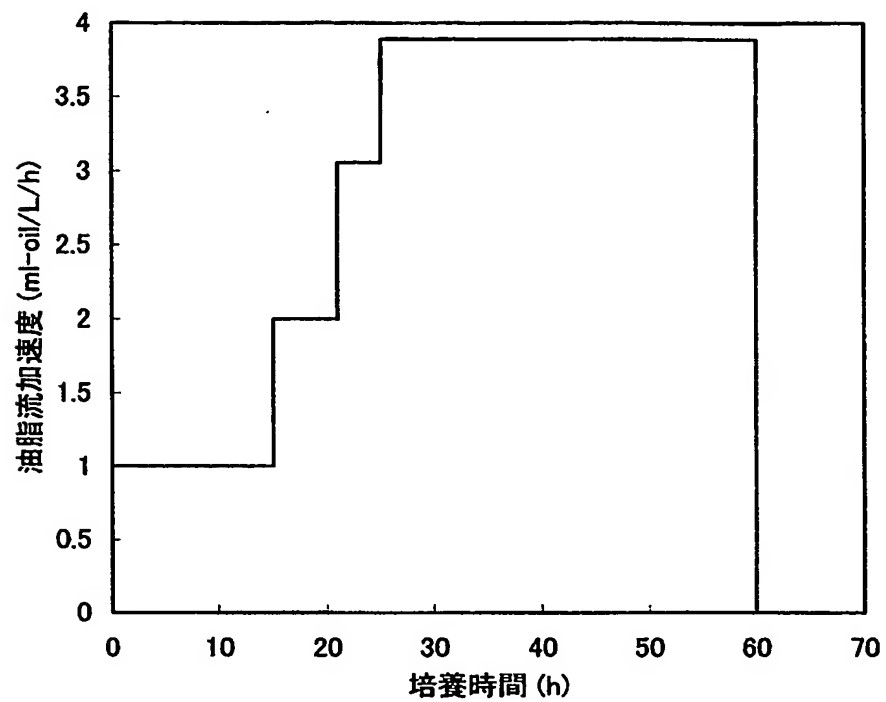
##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1，4，5における油脂の流加パターンを示す図である。

【書類名】

図面

【図 1】



## 【書類名】

要約書

## 【要約】

## 【課題】

低コストで高生産性を確保しつつ好ましい品質を有する共重合ポリエステルの生産技術を開発すること。好ましくは、4 mol %以上の3HH含有率を有するP(3HB-co-3HH)を40 g/L以上の高生産性を確保しながら生産すること。

## 【解決手段】

栄養源であるリンを制限した条件下で、構成脂肪酸としてラウリン酸を含有する油脂を炭素源として用いて、微生物を培養して、3HBと3HHからなる共重合ポリエステルを生産する。



特願 2 0 0 2 - 2 9 7 6 0 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 0 9 4 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 7 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島 3 丁目 2 番 4 号

氏 名

鐘淵化学工業株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**